



FLBI 663

L3 parcours Biologie Fonctionnelle des Plantes

Année universitaire 2007-2008

Analyse de la variabilité de l'expression du transgène GUSA dans les vitroplants transformés de première génération chez *Hevea brasiliensis*.

Elise Bénistant

Dans le cadre du projet: Propagation de matériel transformé

Responsable d'équipe : Pascal Montoro

Encadrant : Ludovic Lardet.



UMR DAP

Equipe BURST

Sommaire :

1- Introduction :

- 1-1 Généralités
- 1-2 L'hévéaculture, situation et enjeux
- 1-3 Contexte scientifique
- 1-4 Sujet de l'étude

2- Matériel et méthodes :

- 2-1 Obtention du matériel végétal transformé
- 2-2 Procédé de régénération par embryogenèse somatique
- 2-3 Principe de l'analyse de l'expression du gène GUSA
- 2-4 Préparation des extraits protéiques
- 2-5 Dosage des protéines totales
- 2-6 Minigreffage des vitroplants transformés
- 2-7 Observation de la fluorescence de la GFP :

3- Résultats :

- 3-1 Variabilité inter-lignée d'activité GUS
- 3-2 Variabilité intra-lignée d'activité GUS
- 3-3 Variabilité d'activité GUS entre deux lignées sœurs
- 3-4 Activité GUS identique dans trois lignées différentes
- 3-5 Variabilité d'activité GUS dans les différents étages foliaires d'un même plant

4- Discussion :

- 4-1 Evaluation de potentielles erreurs dues à des variations biologiques
- 4-2 Evaluation de potentielles erreurs dues à des variations expérimentales
- 4-3 Pas d'effet positionnel détecté pour trois des lignées testées
- 4-4 Implication des variations somaclonales et lignage cellulaire
- 4-5 Impacts des facteurs physiologiques sur l'activité GUS
- 4-6 Intérêt des vitroplants issus d'embryogenèse somatique et perspectives d'utilisation d'autres modes de propagation

1- Introduction :

1-1 Généralités :

Le caoutchouc naturel provient du latex d'un arbre de la famille des euphorbiacées appelé l'hévéa (*Hevea brasiliensis*), le latex n'est autre que le cytoplasme de cellules spécialisées, les laticifères. La récolte s'effectue en saignant les arbres, c'est-à-dire en pratiquant des incisions en spirales au niveau des laticifères. Le caoutchouc naturel contenu dans le latex est alors coagulé à l'aide d'acide acétique, puis crêpé, découpé en granules qui seront lavés, déshydratés puis conditionnés en balles de 15 kilos. Ces balles seront ensuite exportées vers les usines de transformation pour obtenir le produit final désiré.

1-2 L'hévéaculture, situation et enjeux :

Les pays industrialisés ou en voie d'industrialisation sont complètement dépendants de la production de caoutchouc naturel, ne serait-ce qu'à cause de l'industrie automobile. Bien que du caoutchouc synthétique provenant de l'industrie pétrolière soit sur le marché, ce produit de remplacement n'égale pas son homologue naturel. Plus grande élasticité, résistance, bonne capacité d'adhérence, faible échauffement interne, le caoutchouc naturel dispose de nombreux avantages. De plus la fabrication du caoutchouc synthétique devient de plus en plus chère avec la montée du prix du pétrole. Il faut aussi ajouter les avantages écologiques de cette culture, l'hévéa est fixateur de CO₂, son utilisation préférentielle par rapport à la pétrochimie permettra du coup une économie d'énergie fossile. Sa culture permet également la protection des sols tropicaux fréquemment victimes de lessivage ainsi que leur régénération. Enfin, d'un point de vue économique et développemental, l'hévéa étant cultivé en grande partie en Asie (92%) en Afrique et en Amérique Latine, il constitue une source économique non négligeable pour ces pays, et par conséquent aide à leur développement. De plus, les producteurs peuvent effectuer des cultures intercalaires le temps que la parcelle atteigne son âge d'exploitation. Les hévéas peuvent aussi être plantés et exploités en petit nombre et en complément d'autres cultures telles que les cultures vivrières. Pour finir, en fin d'exploitation, le bois d'hévéa peut être vendu pour la fabrication de meubles.

Depuis 30 ans la demande de caoutchouc ne fait qu'augmenter et la proportion de caoutchouc naturel sur le marché de l'élastomère est passée de 30% à 43%. Cette demande vient d'une

part des pays industrialisés, mais surtout des pays émergents dont l'industrialisation est en pleine expansion.

Par conséquent, face au progrès de la chimie, et face à cette demande industrielle, l'hévéaculture doit relever le défi d'améliorer sa productivité et ce sur le long terme. Pour ce faire, une amélioration des techniques d'exploitation ainsi que du matériel végétal est nécessaire.

1-3 Contexte scientifique :

La sélection par les méthodes conventionnelles est difficile à mettre en place chez l'hévéa. En effet, l'hévéa est une plante allogame, le cycle biologique de l'arbre est long et les taux de fertilité femelle et de nouaison sont faibles. Une forte auto-incompatibilité a également été observée ce qui rend difficile la réalisation d'autofécondation contrôlée (Clement-Demange A. et al., 1997). Ensuite il faut attendre 5 à 7 ans pour effectuer une première saignée et 10 à 15 ans d'exploitation pour évaluer le potentiel de production d'une nouvelle sélection. Aujourd'hui les génotypes haut-producteurs sont propagés par greffage sur semis non sélectionnés.

L'exploitation du caoutchouc naturel provoque naturellement une situation de stress chez l'arbre. En fait, la blessure engendre un stress oxydatif qui entraîne la libération d'une protéine, appelé hévéine, dans le cytoplasme (l'hévéine se trouve dans des vésicules appelées lutoïdes) qui, en se fixant sur un récepteur spécifique, fait coaguler le latex et arrête son écoulement. La surexploitation des arbres exacerbe ce phénomène et peut aboutir à l'arrêt prématuré de l'écoulement ou pire à l'absence d'écoulement (Gidrol et al., 1994). Ce phénomène est appelé encoche sèche. Dans un souci d'amélioration de la productivité et de gestion durable de la production, un des défis actuels est de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la production de caoutchouc, notamment ceux liés au stress d'exploitation.

La transgénèse, développée au CIRAD depuis les années 90 (Montoro et al, 2000) se révèle être un outil de choix pour ce type d'étude. Les gènes d'intérêts impliqués dans le processus de détoxification des différentes formes d'oxygène toxiques (ROS) libérées lors du stress ont été identifiés et les premiers essais de transformation avec certains de ces gènes ont été réalisés (Leclercq et al., 2007). La technique de transformation se fait par coculture de cals embryogènes avec une souche d'*Agrobacterium Tumefaciens*. La technique de transformation

par *Agrobacterium* ainsi que le procédé de régénération par embryogenèse somatique peuvent être à l'origine de perturbations telles que variations génétiques ou épigénétiques ((Lucht et al., 2002); discussed by (Labra et al., 2004), reviewed by (Filipecki and Malepszy, 2006)). Des variations d'expression du transgène ont déjà été remarquées chez le tabac, entre plusieurs lignées transgéniques ainsi qu'au sein d'une même lignée ((Hobbs et al., 1990); (Peach and Velten, 1991); quoted by (Filipecki and Malepszy, 2006)). Des phénomènes d'extinction génique ont aussi été observés.

Plusieurs facteurs peuvent être corrélés à ces observations :

- nombre de copies du transgène
- lieu d'insertion du transgène dans le génome hôte
- variations somaclonales dues à la technique de régénération
- état physiologique des plantes (stade développemental, facteur environnement)
- mauvaise standardisation des conditions expérimentales

(Filipecki and Malepszy, 2006)

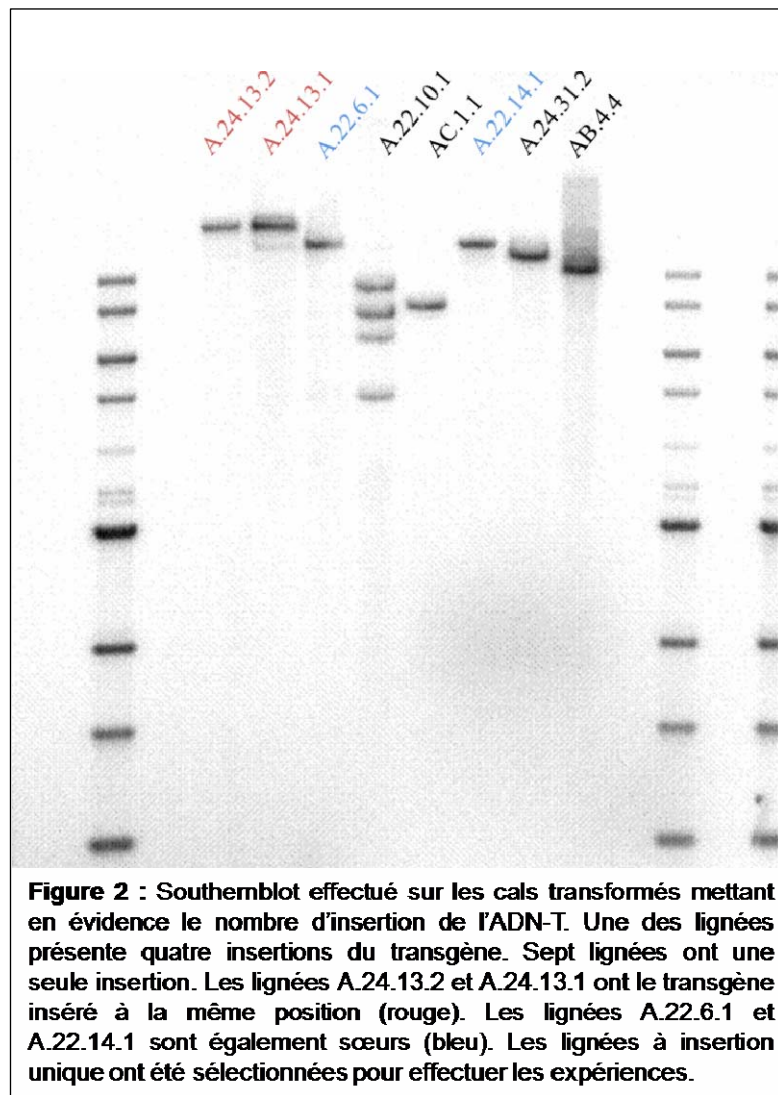
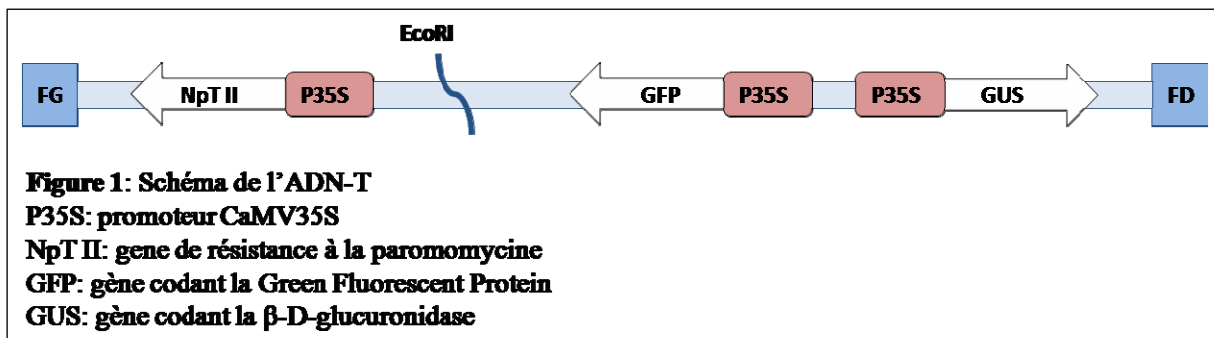
1-4 Sujet de l'étude :

Mon étude a pour but d'évaluer le niveau d'expression du gène rapporteur *gusA* chez des plants régénérés par embryogenèse somatique (plants de première génération) et d'estimer la variabilité de l'expression entre les plants d'une même lignée transgénique (variabilité intra-lignée), entre les plants de différentes lignées (variabilité inter-lignée) et au cours du développement du plant. L'objectif du projet dans lequel se situe mon sujet est d'apprécier le niveau et la variabilité d'expression du gène *gusA* en utilisant la technique de dosage de l'activité GUS par fluorimétrie entre les plants de première génération et leurs clones propagés par greffage et par microbouturage (Lardet et al., 1994).

2- Matériel et méthodes :

2-1 Obtention du matériel végétal transformé :

Les lignées de cals transgéniques ont été obtenues par coculture de cals friables embryogènes (lignée sauvage CI05519) avec la souche EHA105 d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide modifié pCAMBIA2301 selon la procédure décrite par (Blanc et al., 2006).



La construction génétique contient deux gènes rapporteurs : *gusA* et *gfp* ainsi qu'un gène de résistance aux antibiotiques de type aminoglycoside (Kanamycine, Paromomycine, Néomycine, G418), tous les trois sous contrôles de promoteurs CaMV35S. Le gène *gusA* code la β -D-glucuronidase et le gène *gfp* code une protéine fluorescente (Green Fluorescent Protein) (Figure n°1).

L'analyse de l'expression du gène *gusA* a été réalisée sur 10 plants de 6 lignées dont deux apparaissaient sœurs (même niveau d'insertion du transgène) selon l'analyse de southernblot (Figure n°2). Chaque lignée choisie possède une insertion du transgène.

2-2 Procédé de régénération par embryogenèse somatique :

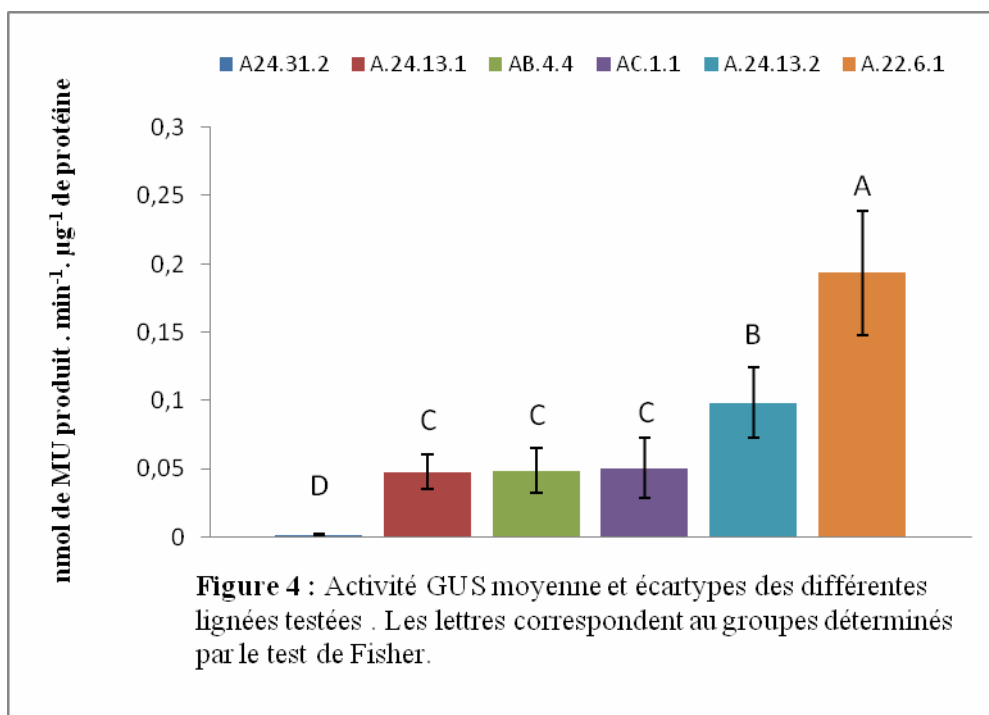
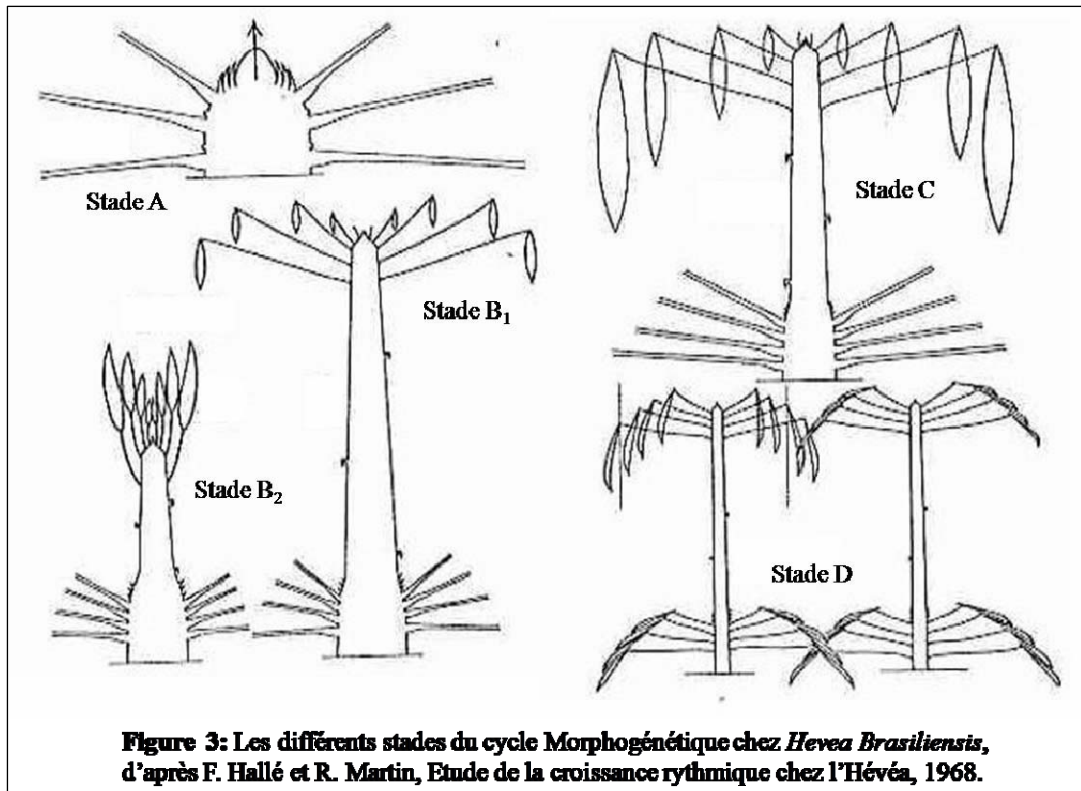
Le procédé d'embryogénèse somatique permettant l'obtention de cals embryogènes et la régénération de plants est décrit dans (Carron et al., 1998). Les plants ont été acclimatés et cultivés dans une serre de type S2 du CIRAD. Au moment de l'analyse, les plants sont âgés de 6 à 8 mois après acclimatation.

2-3 Principe de l'analyse de l'expression du gène *gusA* :

La technique utilisée est la quantification de l'expression du gène *gusA* par la mesure de l'activité de la β -D-glucuronidase. Cette enzyme catalyse la transformation du substrat MUG (4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide) en MU (4-méthylumbellifère). Lorsque qu'il est excité à 355 nm, le MU fluoresce à une longueur d'onde de 460nm. Le protocole de quantification de l'activité GUS mis en place lors du stage de Julien Miss en 2007, a été appliqué puis amélioré au cours de l'étude. Il est décrit dans l'annexe. Le fluorimètre utilisé est un [Fluoroskan Ascent version 2.6](#). L'activité de la β -D-glucuronidase est exprimée par nmole de MU produite par minute et par μ g de protéine totale (nmole MU. min⁻¹. μ g⁻¹ de protéine). Chaque échantillon est analysé en triplicat.

2-4 Préparation des extraits protéiques :

Les extraits protéiques sont réalisés à partir de feuilles vert foncé, récoltées au stade mature (stade D) sur les étages n- 3 (Figure n°3). Un extrait protéique de feuille de plant non transformé est réalisé en temps que contrôle négatif. Les feuilles sont broyées dans de l'azote



liquide. Les broyats repris dans du tampon d'extraction des protéines sont centrifugés à deux reprises à 4°C, 15000 rpm et pendant 15 minutes. Le surnageant constitue l'extrait protéique à partir duquel les dosages de protéines et d'activité GUS sont réalisés.

2-5 Dosage des protéines totales :

La teneur en protéines totale a été mesurée suivant la méthode de Bradford ([Bradford, 1976](#)) avec une gamme étalon de BSA (Bovine serum albumin) allant de 0 à 6 µg/µL.

2-6 Minigreffage des vitroplants transformés :

Cinq plants d'une lignée transgénique ont été greffés, à raison d'environ 10 greffes par plants selon la technique du minigreffage en vert développé au CIRAD.

Une fenêtre d'environ 1,5 cm sur 1 cm est réalisée sur les porte-greffes de manière à enlever l'écorce encore verte du porte greffe. Le greffon, prélevé sur le vitroplant et constitué par une languette d'écorce de même dimension portant un œil dormant est plaqué sur la fenêtre du porte-greffe. Les greffes sont emmaillotés avec du parafilm. Après démaillotage et étêtage des porte-greffes, les greffons encore verts débourrent.

2-7 Observation de la fluorescence de la GFP :

La fluorescence de la GFP est observée sous UV à l'aide d'un microscope système macro zoom (Olympus MVX 10).

3- Résultats :

3-1 Variabilité inter-lignée d'activité GUS :

Les résultats sont présentés dans la figure n°4.

L'activité GUS moyenne des six lignées est variable. D'après le test de Fisher on peut les classer en quatre groupes : une lignée qui ne présente pas d'activité GUS (groupe D), trois lignées qui ont une activité considérée identique (groupe C), et deux autres lignées ayant une activité GUS supérieure et significativement différentes l'une de l'autre (groupes A et B).

Lignées	Moyenne	Ecart type	Coefficient de variation
A.24.13.1	0,04765	0,01285399	26,9758399
AB.4.4	0,0488	0,01629281	33,3868993
AC.1.1	0,0506	0,02231691	44,104564
A.24.13.2	0,0982	0,02583194	26,3054332
A.22.6.1	0,1936	0,04559532	23,5513024

Figure 5 : Coefficient de variation au sein de chaque lignée, calculé sur 10 plants.

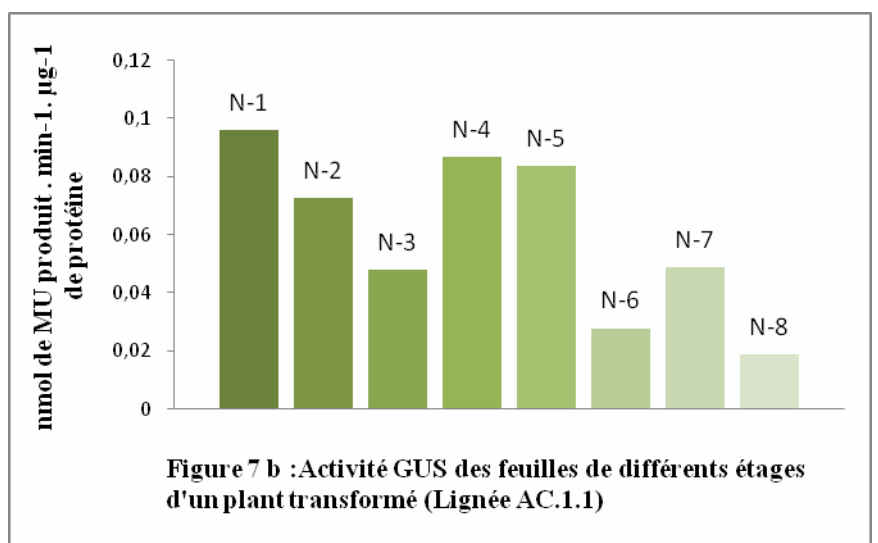
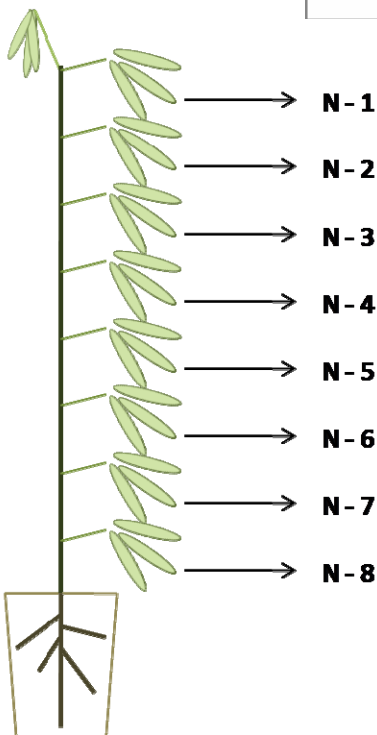
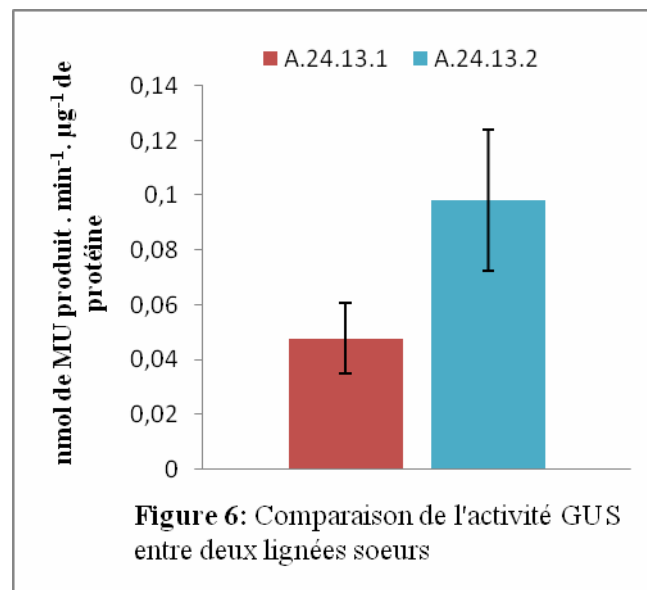


Figure 7 a: Schéma de prélèvement des feuilles et numéro des étages sur lesquels les feuilles ont été prélevées

La lignée A.24.31.2, qui ne présente pas d'activité GUS, a également été testée pour la présence ou non de GFP. Cette lignée n'exprime pas la GFP, on vérifiera par la suite par PCR si cette lignée a bien été transformée.

3-2 Variabilité intra-lignée de d'activité GUS :

Les résultats sont présentés dans la figure n°5.

Le coefficient de variation calculé sur les dix plants de chaque lignée est variable d'une lignée à une autre et est de manière générale assez élevé (supérieure à 10%). L'activité GUS n'est donc pas homogène au sein d'une même lignée.

3-3 Variabilité d'activité GUS entre deux lignées sœurs :

Les résultats sont présentés dans la figure n°6.

Les lignées A.24.13.1 et A.24.13.2 ont été considérées comme sœurs d'après le southernblot car le transgène s'est inséré au même endroit du génome (Figure n°2). Pourtant d'après le test de Fisher, ces deux lignées présentent un taux d'expression du transgène significativement différent. La variation observée n'est donc pas due à un effet de position du transgène.

3-4 Activité GUS identique dans trois lignées différentes :

Les trois lignées considérées comme identiques selon le test de Fisher (Figure n°4) sont différentes d'après le southernblot (Figure n°2). Le transgène est inséré à des endroits différents chez ces trois lignées. La différence de position du transgène dans le génome n'affecte pas ici le niveau d'activité GUS.

3-5 Variabilité d'activité GUS dans les différents étages foliaires d'un même plant:

On a prélevé une feuille mature de chaque étage foliaire d'un plant appartenant à la lignée AC.1.1. (Figure n°7a). On observe une activité hétérogène entre les différents étages. L'activité GUS est de tendance plus forte dans les feuilles nouvellement formées que dans les feuilles premièrement formées, ce qui traduit une baisse de l'activité GUS au cours du temps chez la feuille mature (Figure 7b). A noter que la variabilité observée le long du plant rentre dans l'écart type de la lignée calculé sur les 10 plants testés (Figure n°4).

4- Discussion :

Dans cette étude nous avons décidé d'étudier le taux d'expression du gène *gusA* à travers une technique permettant la mesure de l'activité de la β -D-glucuronidase codée par ce gène. Des variations d'expression ont été mises en évidence entre les différentes lignées testées, au sein même d'une lignée ainsi qu'au cours de la croissance du plant.

Les variations d'expression entre différents plants transformés peuvent être dues à plusieurs facteurs. Tout d'abord le nombre de copies du transgène peut faire varier l'expression du transgène de plus de cent fois (Hobbs et al., 1990). L'expression du transgène peut également varier au sein d'une même lignée. Cette variation serait en partie due à un effet de position du transgène au sein du génome (Peach and Velten, 1991). De même la technique d'embryogenèse est une source de variation chez les plants régénérés (Phillips et al., 1994). Des variations de délai de germination, de croissance du plant ont été rapportées (Données non publiées). Il a été rapporté que ces variations sont importantes, et que la plus grande part des variations observées chez les plants transformés est due à la technique de culture cellulaire plus qu'à la transformation elle-même (Labra et al., 2004). Ces variations sont de nature génétiques ou épigénétiques. Elles sont stables au cours des mitoses ((Filipecki and Malepszy, 2006) ;(Kaeppler et al., 2000)). Ce type de variation est donc à prendre en compte dans l'interprétation de nos résultats et justifie l'intérêt porté sur l'étude de la stabilité du transgène dans les différents modes de propagation.

Les essais ont été réalisés de manière à éliminer le plus de facteurs de variation possible. Premièrement, les lignées choisies portent qu'une seule copie du transgène de manière à éliminer la part de la variation due au nombre d'insertions. Ensuite, les conditions expérimentales ont été optimisées afin de réduire la part de variation due aux conditions expérimentales et biologiques des échantillons. Les différents facteurs pouvant influencer l'expression du transgène dans le cas de notre étude sont présentés dans la discussion qui suit.

4-1 Evaluation de potentielles erreurs dues à des variations biologiques:

Le numéro de l'unité de croissance sur laquelle a été prélevée chaque feuille n'a pas été précisément relevé. (Sauf pour l'expérience comparant l'activité GUS dans les différentes unités de croissance) Cependant, les lignées ont toutes été testées durant une période rapprochée, les plants étaient donc à peu près au même stade de développement et à chaque fois ce sont les feuilles au stade D non nécrosées les plus basses qui ont été choisies, ce qui correspond en moyenne au stade n-3.

Une variation de l'activité GUS due à une évolution de l'activité transcriptionnelle de la plante au cours de la journée est peu probable car les échantillons ont tous été prélevés au même moment de la journée (10h du matin). La variation de luminosité due aux aléas du climat durant cette période n'a pas été prise en compte, cependant une étude sur le tabac a révélé une activité GUS similaire dans des plants de tabac transformés mis sous conditions lumineuse soit élevée soit faible ((Hobbs et al., 1990), reviewed by (James et al., 2004)).

4-2 Evaluation de potentielles erreurs dues à des variations expérimentales:

Dosage des protéines :

A chaque essai une à trois gammes étalon de BSA ont été réalisées. La micropipette utilisée pour la gamme étalon ainsi que pour les essais a été testée. La gamme étalon a été réalisée dans sa partie la plus linéaire (de 0 à 6µg/µL). Les extraits protéiques ont été dilués de manière à ce qu'ils soient compris dans la gamme étalon. Les essais ont été réalisés en duplicat et la différence entre les deux mesures était à chaque fois faible.

Dosage de l'activité GUS :

Pour chaque extrait protéique testé, trois réplicas ont été réalisés. L'écart type calculé sur les différents réplicas d'un même essai est faible, de plus il est constant au cours du temps ce qui signifie que la pente de la courbe est sensiblement la même pour les trois réplicas.

Les différentes mesures ont été prises toutes les dix minutes pendant une heure et le coefficient de corrélation (R^2) de la droite alors obtenue était à chaque fois supérieure à 0,98 (que se soit pour la gamme étalon ou pour les extraits). Les conditions expérimentales liées aux analyses ont donc été optimisées et a priori n'interviennent pas dans la variabilité observée notamment au niveau intra-lignée.

4-3 Pas d'effet positionnel détecté pour trois des lignées testées :

La position du transgène est connue pour être un facteur expliquant certaines variations d'expression. (Hobbs 1990, Peach 1991).

L'activité GUS mesurée est la même parmi trois lignées indépendantes testées ce qui tend à limiter l'effet positionnel dans nos expériences. Toutefois, l'étude de l'expression du gène CuZnSOD chez des cals transgéniques d'hévéa révèle une forte variabilité d'expression entre lignées indépendantes et à une insertion ([Résultats présentés par Virginie Gebelin lors du BML à Nancy en 2008](#)). Chez des plants d'arabette, une variation d'expression du simple au double a été considérée comme faible dans différentes lignées indépendantes ([Schubert et al., 2004](#)).

4-4 Implication des variations somaclonales et lignage cellulaire:

Dans le cas de deux lignées sœurs (A.24.13.1 et A.24.13.2), issues d'un même événement de transformation, une forte variation d'activité GUS est observée. Cette variation est donc survenue lors de la prolifération des tissus à partir ces cellules filles qui ont évolué séparément. En effet, les conditions de culture provoquent un stress cellulaire qui induit des mutations génétiques et des variations somaclonales de type épigénétiques qui sont stables au cours des mitoses ([\(Filipecki and Malepszy, 2006\)](#); [\(Kaeppler et al., 2000\)](#)).

La technique de transformation chez *Hevea brasiliensis* nécessite une phase de prolifération cellulaire et de régénération par embryogenèse somatique susceptibles d'engendrer des variations somaclonales. Afin de limiter le risque d'apparition de telles variations, les lignées de cals embryogènes sauvages et transgéniques sont rapidement cryoconservés après obtention ([Lardet et al., 2007](#)).

4-5 Impacts des facteurs physiologiques sur l'activité GUS :

L'âge physiologique des tissus peut-être à l'origine des variations observées lors de la mesure de l'activité GUS au cours de la croissance du plant. Ce phénomène a été observé lors de l'expérience réalisée sur les feuilles matures collectées sur différentes unités de croissance et chez d'autres espèces végétales comme le riz ([James et al., 2004](#)). Cependant, il ne faut pas oublier que nous avons mesuré l'activité de l'enzyme codée par *gusA* et non le taux d'expression du gène, or la β -D-glucuronidase est une enzyme stable au cours du temps, des

phénomènes d'accumulations de l'enzyme peuvent donc également influencer nos résultats (James et al., 2004).

4-6 Intérêt des vitroplants issus d'embryogenèse somatique et perspectives d'utilisation d'autres modes de propagation :

L'objectif du projet dans lequel s'est situé mon sujet est d'apprécier le niveau et la variabilité d'expression du gène *gusA* entre plants de première génération issus d'embryogenèse somatique ainsi que dans leur clones propagés par greffage et par microbouturage.

Dans le cas des plants obtenus par embryogenèse somatique, on a observé une variabilité d'activité GUS au sein d'une même lignée. Celle-ci demeure nettement inférieure à la variabilité inter-lignée. La discrimination des différentes lignées est par conséquent possible. L'embryogenèse somatique peut donc être utilisée comme moyen de propagation du matériel transformé afin d'étudier l'expression de gènes d'intérêt. De ce fait, des les vitroplants portant la construction 35S :: CuZnSOD régénérés en 2007 pourront être étudiés directement sans passer par d'autres modes de propagation. Toutefois, l'utilisation du microbouturage et du greffage à partir de vitroplants issus d'embryogenèse somatique est prévu en vue d'homogénéiser l'état physiologique du matériel végétal de chaque lignée. Cinq vitroplants de la lignée A.24.13.2 ont déjà été greffés et l'activité GUS sera prochainement évaluée sur ces plants. Les autres lignées seront greffées successivement en fonction de l'approvisionnement en porte-greffe. La technique de micropropagation des jeunes plantules issues d'embryogenèse somatique est en cours de mise au point.

Bibliographie :

- Blanc G, Baptiste C, Oliver G, Martin F, Montoro P** (2006) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryogenic calli and regeneration of *Hevea brasiliensis* Mull Arg. plants. *Plant Cell Rep* **24**: 724-733
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Carron MP, Lardet L, Dea BG** (1998) Micropropagation de l'hévéa par embryogenèse somatique. *Plantations, recherche, développement* **5**: 187-194
- Clement-Demange A., Legnaté H., Seguin M., Carron M.P., Le guen V., T. C** (1997) L'amélioration des plantes tropicales (CIRAD), Vol L'Hévéa
- Filipecki M, Malepszy S** (2006) Unintended consequences of plant transformation: a molecular insight. *J Appl Genet* **47**: 277-286
- Gidrol X, Chrestin H, Tan HL, Kush A** (1994) Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex. *J Biol Chem* **269**: 9278-9283
- Hobbs SL, Kpodar P, DeLong CM** (1990) The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. *Plant Mol Biol* **15**: 851-864
- James VA, Worland B, Snape JW, Vain P** (2004) Development of a standard operating procedure (SOP) for the precise quantification of transgene expression levels in rice plants. *Physiol Plant* **120**: 650-656
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y** (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol* **43**: 179-188
- Labra M, Vannini C, Grassi F, Bracale M, Balsemin M, Basso B, Sala F** (2004) Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. *Theor Appl Genet* **109**: 1512-1518
- Lardet L, Bes M, Enjalric F, Carron MP** (1994) Mineral imbalance in *Hevea brasiliensis* microcuttings: relation with *in vitro* multiplication and acclimatization. *Journal of Plant Nutrition* **17**: 2135-2150
- Lardet L, Martin F, Dessailly F, Carron MP, Montoro P** (2007) Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). *Plant Cell Rep* **26**: 559-569
- Leclercq J, Martin F, Lardet L, Rio M, Montoro P** (2007) Genetic transformation and regeneration of plant over-expressing CuZnSOD gene to control oxidative stress in rubber tree. In C IRRDB, ed, International Natural Rubber Conference, Siem Reap, Cambodia
- Lucht JM, Mauch-Mani B, Steiner HY, Metraux JP, Ryals J, Hohn B** (2002) Pathogen stress increases somatic recombination frequency in *Arabidopsis*. *Nat Genet* **30**: 311-314
- Peach C, Velten J** (1991) Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. *Plant Mol Biol* **17**: 49-60
- Phillips RL, Kaeppler SM, Olhoft P** (1994) Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 5222-5226
- Schubert D, Lechtenberg B, Forsbach A, Gils M, Bahadur S, Schmidt R** (2004) Silencing in *Arabidopsis* T-DNA Transformants: The Predominant Role of a Gene-Specific RNA Sensing Mechanism versus Position Effects
10.1105/tpc.104.024547. *Plant Cell* **16**: 2561-2572

ANNEXE :

EXTRACTION DES PROTEINES SOLUBLES ET DOSAGE

1. Extraction des protéines

Préparation du tampon d'extraction

On a besoin de 100 mL de tampon pour 1 plaque de 84 échantillons.

On commence la fabrication du tampon avec 98 mL de solution de NaHPO_4 , 50 mM, pH 7.

Na_2EDTA 0,5 M pH 8	10 mM	2 mL
Na-laurylsarcosine (M=293,4)	0,1 %	100 mg
Triton X-100 pur	0,1 %	100 μL
NaHPO_4 , 50 mM, pH 7	50 mM	qsp 100 mL

*La solution de NaHPO_4 , 50 mM, pH 7,0 se prépare en mélangeant :

NaH_2PO_4 , 2 H_2O 200 mM 39 mL

Na_2HPO_4 , 7 H_2O 200 mM 61 mL

Eau (qsp 400 mL) 300 mL

Collecte des feuilles

Les feuilles (stade D, bien verte, sans zone de nécrose) sont collectées, numérotées et déposées sur de la glace jusqu'au broyage.

Broyage des échantillons

Juste avant l'extraction les mortiers, les pilons et les spatules sont mises à refroidir dans l'azote liquide. Oter la nervure des feuilles. Broyer les échantillons (environ 200 mg de feuille = 1 foliole) dans l'azote liquide. Récupérer les broyats dans des tubes Ependorf de 1,5 mL. Ajouter 600 μL de tampon d'extraction. Homogénéiser par agitation et centrifuger 15 min à 4°C et 15000 rpm. Récupérer le surnageant puis le centrifuger 15 min à 4°C et 15000 rpm. Récupérer le surnageant. Les échantillons sont conservables congelés

2. Dosage des protéines (Méthode Bradford)

Réalisation de la gamme étalon dans des cuves pour spectrophotomètre :

Sol° BSA (1mg/mL)	0	2 μL	3 μL	4 μL	5 μL	6 μL
H_2O	800 μL	798 μL	797 μL	796 μL	795 μL	794 μL

Préparation des échantillons dans des cuves pour spectrophotomètre :

Mettre dans la cuve 798 μL d' H_2O , 2 μL d'extrait protéique auparavant dilués deux fois.

Mesure de la D.O. à 595 nm :

Ajouter 200 μL de solution de Bradford auparavant diluée 5 fois dans chaque cuve, agiter les cuves à l'aide de parafilm, puis effectuer les mesures.

3. Dosage de l'activité GUS

3.1. Préparation d'une gamme étalon de MU (4-méthylumbellifère)

- **Préparer une solution stock de MU à 10mM** (cette solution doit être protégée de la lumière dans du papier aluminium et peut être conservée à 4°C jusqu'à un mois)

La solution se prépare en respectant les proportions suivantes : 1,98 mg de MU dans 1 ml d'eau. (1ml de MU est suffisant pour effectuer la gamme étalon)

- **Préparer une solution de MU diluée à 1 mM à partir de la solution stock à 10mM**

- **Préparer une solution de MU diluée à 100 μ M à partir de la solution stock à 1mM**
Protéger les dilutions de la lumière dans du papier aluminium

Réalisation de la gamme étalon :

1. solution à 100 μ M : 50 μ l de MU à **1 mM** + 450 μ L de tampon d'extraction
2. solution à 50 μ M : 50 μ l de MU à **1 mM** + 950 μ L de tampon d'extraction
3. solution à 20 μ M : 20 μ L de MU à **1 mM** + 980 μ L de tampon d'extraction
4. solution à 10 μ M : 10 μ L de MU à **1 mM** + 990 μ L de tampon d'extraction
5. solution à 5 μ M : 50 μ L de MU à **100 μ M** + 950 μ L de tampon d'extraction
6. solution à 2,5 μ M : 25 μ L de MU à **100 μ M** + 975 μ L de tampon d'extraction
7. solution à 1 μ M : 10 μ L de MU à **100 μ M** + 990 μ L de tampon d'extraction
8. tampon d'extraction

Protéger les dilutions de la lumière dans du papier aluminium

3.2. Préparation d'une solution de substrat MUG

- **Préparation d'une solution stock à 10 mM** : (protéger de la lumière dans du papier aluminium et conserver à 4°C jusqu'à 1 mois)

La solution se prépare en respectant les proportions suivantes : 3,52 mg de MUG dans 1 ml d'eau. (On aura besoin de 40 μ L de MUG pour chaque échantillon)

3.4. Préparation des échantillons :

Dans la plaque destinée au spectrofluorimètre :

→ Gamme étalon de MU : déposer 200 μ L de chaque solution dans 8 puits bien identifiés (15, 10, 5, 2, 1,5, 1, 0,5 et 0 nmol)

→ Echantillons protéiques :

Déposer 152 μ L de tampon d'extraction

Ajouter 8 μ L de solution protéique auparavant diluée à 0,125 μ g. μ L⁻¹

(Les dilutions peuvent s'effectuer dans une plaque en prenant comme base 10 μ L d'extrait et en ajustant la quantité de tampon afin d'obtenir 0,125 μ g. μ L⁻¹ de protéine)

Ajouter 40 μ L de MUG 10 mM au dernier moment.

Il y aura donc 1 μ g de protéine dans chaque puits.

3.5. Dosage de l'activité GUS

Programme Fluoroskan Ascent v2.6.

Ouvrir le fichier GUS2.SEF

- Session **LAYOUT**

Area definition : supprimer (remove) les puits non utilisés. Définir les types de puits. Pour les calibrateurs donner les concentrations (apply)

- Session **MEASURE**

unit : fluo

step time : 0

type : cinétique

intégration : 200 ms

lag time : 5 min (permet la montée en température de la plaque)

intervalle : **10 min**

measure count : **7 (environs 1h)**

beam : ✓ normal

vérifier les longueurs d'onde (Ex : 355 nm, Em : 460 nm)

- Session **INCUBATE**

incubation time : 0

temperature : **37°C**

- Session **SHAKE**

diameter : 1

speed : 900

ON time : 30 s (agitation pendant 30 s après chaque mesure)

OFF time : 0

background mode : ✓ (agitation continue)

- **PLATE OUT, PLATE IN** puis **START**

Remerciements:

J'aimerais remercier Ludovic Lardet pour sa pédagogie et sa patience envers moi. J'aimerais également remercier Pascal Montoro pour le temps qu'il m'a accordé malgré tout le travail qu'il a à faire. Un grand merci à toute l'équipe pour leur accueil, leur sympathie et leur bonne humeur, et tout particulièrement Gérald qui m'a beaucoup appris en serre, Florence Chazot pour sa joie de vivre et Florence Martin pour sa disponibilité. Merci également à Florence Dessailly de m'avoir prêté ses pipettes tout le long du stage. Merci à tous les stagiaires du CIRAD Lavalette avec qui j'ai pu réfléchir, discuter et échanger quelques fous rires... Un grand merci à tous !

Résumé :

Un programme de transformation génétique a été développé chez *Hevea brasiliensis*. Ce programme vise à mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le stress d'exploitation des arbres. Des premiers essais de transformation avec des gènes impliqués dans les mécanismes de détoxification cellulaire ont été déjà réalisés.

Dans le but d'optimiser les conditions expérimentales liées à l'analyse de l'expression des transgènes, nous avons cherché à évaluer la variabilité de l'expression du gène rapporteur *gusA* sous l'influence d'un promoteur constitutif fort (CaMV35S) chez des plants transformés de première génération. La technique mise en œuvre est le dosage enzymatique de la β -D-glucuronidase codée par *gusA* par fluorimétrie. Les résultats montrent une variabilité inter-lignée supérieure à la variabilité intra-lignée. L'homogénéité relative de l'expression du gène *gusA* chez les plants de première génération permet donc de discriminer les différentes lignées transgéniques. Ce type de matériel végétal pourra donc être utilisé pour l'analyse de l'expression de gène d'intérêt.

Abstract :

A program of genetic transformation has been initiated on *Hevea brasiliensis*. This program focuses on a better understanding of molecular mechanism involved in rubber tree stress exploitation. Primary assays of genetic transformation with interest genes involved in cellular detoxification have yet been attempted.

Because of the need to optimise experimental conditions for transgenes expression analysis, variability of gene expression of the reporter gene *gusA* under control of the constitutive promoter (CaMV35S) has been assessed on primary generation transformed plants.

Fluorimetric assays of β -D-glucuronidase activity were used for quantify *gusA* expression.

We notice a higher variability of gene expression between the plants of different lines than between the plants of the same line.

Relative homogeneity of *gusA* expression in first-generation plants permits us to discriminate the different transgenic lines. Regenerated transgenic plants could be used for gene expression analyses of interest genes.